

基于网络药理学、分子对接和实验验证探讨 朱茯苓用于失眠的作用机制

周 扬¹, 郭冷秋¹, 刘 逊¹, 谈如蓝¹, 钟其新³, 曾 峰^{2*}

¹苏州卫生职业技术学院 苏州检验医学生物技术重点实验室, 苏州 215009;

²广州中医药大学青蒿研究中心, 广州 510445; ³广州中医药大学深圳医院(福田), 深圳 518034

摘要:为探讨朱茯苓治疗失眠的可能作用机制,通过 TCMSp、BAT-MAN、TCMID 和 STITCH 数据库以及文献挖掘筛选朱茯苓的活性成分及潜在靶点,利用 TTD、OMIM、GeneCards 和 CTD 数据库获取失眠类疾病的相关靶点,采用 Cytoscape 软件和 String 数据库构建活性成分-靶点网络和靶点蛋白相互作用网络,通过 BioGPS 数据库进行靶点的器官定位,基于 David 数据库进行 GO 功能和 KEGG 通路的富集分析,利用 Autodock_vina 软件进行活性成分和核心靶点的分子对接验证,最后通过免疫印迹法(Western blot)验证朱茯苓对 γ -氨基丁酸(GABA)的两种受体蛋白 $\alpha 1$ 亚基基因 GABRA1 和 $\gamma 2$ 亚基基因 GABRG2 的影响。最终筛选得到朱茯苓活性成分 33 种,潜在靶点 267 个,与失眠的交集靶点 36 个,多作用于脑、心脏等器官;分子对接结果显示 GABRA1、GABRG2 两个靶点能够与活性成分自发结合并借助氢键等分子间作用力形成较为稳定的构象;富集分析共获得 189 个 GO 条目和 24 条 KEGG 通路,主要涉及 GABA 信号通路、5-羟色胺(5-HT)信号通路等;Western blot 实验证明朱茯苓能够增强小鼠脑内 GABRA1 和 GABRG2 蛋白的表达。通过网络药理学、分子对接和 Western blot 实验验证,发现朱茯苓可能通过多成分、多靶点、多途径的协同作用发挥镇静安神的作用,为深入进行朱茯苓治疗失眠的作用机制研究提供新思路和新方法。

关键词:朱茯苓;失眠;网络药理学;分子对接; γ -氨基丁酸受体

中图分类号:R285;R965

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)1-0114-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.1.015

Study on the mechanism of Zhufuling in insomnia based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification

ZHOU Yang¹, GUO Leng-qiu¹, LIU Xun¹, TAN Ru-lan¹, ZHONG Qi-xin³, ZENG Feng^{2*}

¹Suzhou Key Laboratory of Medical Biotechnology, Suzhou Vocational Health College, Suzhou 215009, China;

²Artemisinin Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510445, China;

³Shenzhen Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518034, China.

Abstract: In order to explore the possible mechanism of Zhufuling in the treatment of insomnia, the active components and potential targets of Zhufuling were screened by TCMSp platform, BAT-MAN database, TCMID database, STITCH database and literature mining; related targets of insomnia diseases were obtained by TTD database, OMIM database, GeneCards database and CTD database, and the active component target network and target protein interaction network were constructed by using Cytoscape software and String database, and the target organs were located by BioGPS database, and GO function and KEGG pathway enrichment analysis were carried out based on David database, and Autodock_Vina software was used to verify the molecular docking of active components and core targets. Western blot was used to verify the effect of Zhufuling on GABA receptor $\alpha 1$ subunit gene (GABRA1) and GABA receptor $\gamma 2$ subunit gene (GABRG2). Finally, 33 kinds of active components, 267 kinds of potential targets and 36 kinds of intersecting targets with insomnia were screened, which were mostly used in brain, heart and other organs. The results of molecular docking showed that GABRA1 and GABRG2 could spontaneously

收稿日期:2020-06-05 接受日期:2020-11-09

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(31901002);苏州市科技局民生科技项目(SYSD2018072);2019年福田区卫生公益科研项目(FTWS2019024);苏州卫生职业技术学院青年科技专项(SZWZY201711)

*通信作者 Tel:86-20-36585204; E-mail: zengfeng@gzucm.edu.cn

combine with the active components and form stable conformations by hydrogen bonding and other intermolecular forces. 189 GO entries and 24 KEGG pathways were obtained by enrichment analysis, which mainly involved GABA signaling pathway and 5-hydroxytryptamine (5-HT) signaling pathway. Western blot showed that Zhufuling could enhance the expression of GABRA1 and GABRG2 protein in mouse brain. Through network pharmacology, molecular docking and Western blot experiments, we found that Zhufuling may play a calming and tranquilizing effect through multi-component, multi-target and multi-channel synergistic effect, which provides new ideas and methods for further research on the mechanism of Zhufuling in the treatment of insomnia.

Key words: Zhufuling; insomnia; network pharmacology; molecular docking; GABA receptor

失眠通常指患者对睡眠时间和(或)质量不足并影响白天社会功能的一种主观体验,是一种常见的生理心理疾患^[1],其发病率约为20%^[2],已日益成为涉及范围甚广的社会热点,引起人们的广泛重视。失眠在中医中亦称“不寐”,指由于外感或内伤等原因,造成阴阳气血及心、肺、脾、肾等脏腑功能失调而引起的无法正常睡眠为特征的一种病症^[3],轻者入睡困难、睡后易醒、醒后不能再寐或时寐时醒等。重者整夜彻夜难眠,长期失眠会给人的正常生活和工作带来严重的不利影响。目前临床治疗失眠的西药以苯二氮卓、非苯二氮卓类为主,此类药物主要作用于神经递质γ-氨基丁酸(GABA)^[4],但副作用大、依赖性强、有成瘾风险。而中医药治疗失眠主要以补虚泻实、调整脏腑阴阳为治则,在治疗失眠方面具有副作用小、无依赖性和成瘾性等优势,越来越受到重视,在临床应用广泛并取得良好的疗效。

茯苓味甘性平,归心、肺、脾和肾经,有利水渗湿、健脾宁心的功效^[5]。茯苓的主要有效成分为茯苓多糖和三萜类物质,相关研究表明茯苓特有的四环三萜化合物茯苓酸具有镇静催眠作用且茯苓酸的催眠效果与调节脑内GABA的A型受体(GABA-A)表达水平有关^[6]。朱砂为硫化物类矿物辰砂族辰砂,主含硫化汞(HgS),朱砂味甘性微寒,归心经,有清心镇惊、安神、明目、解毒的功效,相关研究表明,朱砂能够延长大鼠的慢波睡眠,有效改善大鼠的睡眠^[7]。拌衣炮制是一种传统炮制工艺,朱茯苓即为采用此工艺制成,取茯苓块以清水喷淋,稍闷润后加水飞朱砂细粉撒布均匀,反复翻动,使其外表粘满朱砂粉末,然后晾干而成(每50g茯苓配用水飞朱砂细粉1g)^[8]。《本草纲目》中记载:“茯苓,本草言利小便,伐肾邪……同朱砂能秘真元”。因此理论上,茯苓拌染朱砂后,可共奏镇静安神、祛邪宁心之效,多用于失眠、惊悸、健忘诸症。然而,目前关于朱茯苓治疗失眠的研究和机制探讨的文章尚不多见。

网络药理学紧紧围绕系统生物学、生物网络构

建和分析等进行药物有效性、代谢特性的揭示,是建立在高通量组学数据分析、计算机虚拟计算及网络数据库检索基础上的生物信息网络构建及网络拓扑结构分析策略和技术基础上的科学思想和研究策略。利用网络药理学技术构建多层次网络模型,从整体角度对中药进行研究,已成为一种科学解释中药有效性和科学性的新策略,在多方面的中药研究中已具备了成功应用的经验^[9]。

本研究以朱茯苓镇静安神的功效为切入点,遵循网络药理学理论与技术,筛选朱茯苓活性成分及潜在靶点,构建活性成分-靶点网络,对交集靶点进行器官定位,并进行GO功能和KEGG通路的富集分析以及分子对接验证,通过免疫印迹实验(Western blot)验证朱茯苓对GABA受体α1亚基基因(Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1, GABRA1)和γ2亚基基因(Gamma-aminobutyric acid receptor subunit gamma-2, GABRG2)两种受体蛋白水平的影响,以期从分子层面初步阐述朱茯苓治疗失眠的可能的分子作用机制,为朱茯苓进行后续深入研究提供新思路和新方法。

1 材料与方法

1.1 朱茯苓的活性成分筛选

朱茯苓活性成分的筛选,基于TCMSP平台(<http://tcmospw.com/index.php>)、TCMID数据库(<http://www.megabionet.org/tcmid/>)和BATMAN-TCM数据库(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)以及文献查阅,收集茯苓和朱砂的活性成分,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)和类药性(drug-likeness, DL)筛选区符合条件的候选活性成分和对应靶点,将OB≥30%和DL≥0.18设为筛选条件,针对某些成分虽然OD值和DL值较低但仍具有较强活性这一情况,结合相关活性成分文献记载,得到最终筛选得到的活性成分,使用Pubchem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)验证活性成分并获取其分子结构及PubChem CID等信息。

1.2 靶点的预测与筛选

运用 TCMSp 平台、BATMAN-TCM 数据库和 STITCH 数据库 (<http://stitch.embl.de/>) 预测活性成分的靶点。在 OMIM 数据库 (<https://omim.org/>)、TTD 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、CTD 数据库 (<http://ctdbase.org/>) 和 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 上筛选失眠相关靶点。将活性成分和疾病靶点导入 Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org/>)，筛除非人类靶点并校正靶点名称。

1.3 化合物-靶点相互作用网络及靶点间相互作用网络的构建与分析

将活性成分及其靶点信息导入 Cytoscape_v3.7.2 软件 (<http://www.cytoscape.org/>)，构建化合物-靶点相互作用网络。基于 String 数据库 (<https://string-db.org/>) 获取活性成分和疾病的交集靶点的高置信度 PPI 网络信息，在 Cytoscape 软件中构建靶点间相互作用网络，使用“NetworkAnalyzer”工具对网络进行拓扑分析，根据拓扑参数筛选核心化合物和核心靶点。

1.4 器官定位

将朱茯苓治疗失眠的潜在靶点上传至 BioGps 数据库 (<http://biogps.org/>) 进行器官定位分析，并绘制靶点的器官定位图。

1.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析及化合物-靶点-通路网络的构建

将朱茯苓治疗失眠的潜在靶点上传至 David6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)，选择物种和背景为人 (*Homo sapiens*)，进行 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析并在 Cytoscape 软件中构建化合物-靶点-通路网络。

1.6 分子对接验证

根据上述筛选出的活性成分和核心靶点，从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 获取相应靶点的蛋白结构，使用 Autodock_vina 软件 (<http://vina.scripps.edu/>) 对靶点与核心活性成分和阳性对照药物艾司唑仑 (*estazolam*) 进行分子对接验证。

1.7 Western blot 检测小鼠脑组织中 GABRA1 及 GABRG2 的表达

1.7.1 药材、试剂和仪器

艾司唑仑片 (20180710, 常州四药制药有限公司); 朱砂拌白茯苓饮片 (2017101808, 上海余天成中药饮片有限公司); 戊巴比妥钠 (626Y9216, 美国

Sigma 公司); GABRA1 单克隆抗体、GABRG2 单克隆抗体、 β 肌动蛋白 (β -actin) (AH01126063, AC072366, AH11279138, 北京博奥森生物技术有限公司); Allegra 64R 台式高速冷冻离心机 (美国 Beckman Coulter 公司); PowerPac Basic 型蛋白电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.7.2 动物

健康 SPF 级 ICR 雄性小鼠, 体重 <15 g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物许可证号: SCXK(沪)2017-0005。

1.7.3 实验方法

将 30 只健康 SPF 级雄性 ICR 小鼠适应性饲养 7 天后, 随机分为生理盐水组、艾司唑仑组、朱茯苓水煎液低、中、高剂量组, 分别灌胃相应浓度的药液 (艾司唑仑药液剂量为 0.15 mg/kg, 朱茯苓水煎液低中高剂量分别为 1.14、2.28 和 4.55 g/kg), 给药体积 20 mL/kg, 每天 1 次, 连续灌胃 7 天, 于末次给药 50 min 后腹腔注射戊巴比妥钠阈剂量并禁食 12 h, 脱颈椎处死小鼠, 于冰浴皿上快速取出大脑, 剥去脑膜, 用预冷的生理盐水洗净, 滤纸吸干后, 然后取脑组织加入裂解液, 冰上裂解 1 h 后高速离心取上清, 测定组织蛋白浓度, 以 PAGE 凝胶电泳分离蛋白样品。按照说明书提供的分子量条带选定切胶范围, 湿法转膜, 用封闭液封闭 1 h (含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 缓冲液)。室温孵育后弃去封闭液, 加入一抗在 4 °C 孵育过夜, TBS-T 洗 5 × 5 min, 加入二抗温育 1 h, TBS-T 洗 5 × 5 min, 最后进行显色。

2 结果

2.1 朱茯苓的活性成分及靶点预测

通过 TCMSp 平台、TCMID 数据库、BATMAN-TCM 数据库、STITCH 数据库以及文献查阅, 收集朱茯苓的活性成分并预测其潜在靶点, 筛除重复化合物及缺少靶点预测的化合物后, 使用 Pubchem 数据库验证活性成分的分子结构并获取 PubChem CID 等信息。结果共筛选朱茯苓活性成分 33 种, 其中茯苓 32 种、朱砂 1 种, 经过 Uniprot 筛选和校正的潜在靶点有 267 个。表 1 为朱茯苓的活性成分信息。

2.2 化合物-靶点网络

在 Cytoscape 中构建朱茯苓的化合物-靶点相互作用网络, 使用 Network Analyzer 进行拓扑分析。化合物-靶点网络共有 300 个节点 (包括 33 个化合物和 267 个靶点), 453 条边。网络中一个节点的度 (degree) 表示网络中和节点相连接的路线条数, 活

表 1 朱茯苓的活性成分信息

Table 1 The active components information in Zhufuling

PubChem 标识 PubChem CID	化合物分子名称 Molecule name	化合物分子式 Molecular formula
125	4-Hydroxybenzyl alcohol	C ₇ H ₈ O ₂
190	Adenine	C ₅ H ₅ N ₅
305	Choline	C ₅ H ₁₄ NO ⁺
379	Octanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂
985	Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
3893	Lauric acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂
8180	Undekansaeure	C ₁₁ H ₂₂ O ₂
8194	Dodecanal	C ₁₂ H ₂₄ O
8223	Ergotamine	C ₃₃ H ₃₅ N ₅ O ₅
15448	2-Undecanol	C ₁₁ H ₂₄ O
62402	Mercuric sulfide	HgS
73299	Hederagenin	C ₃₀ H ₄₈ O ₄
73402	Eburicic acid	C ₃₁ H ₅₀ O ₃
74112	Trimethyl citrate	C ₉ H ₁₄ O ₇
92156	Beta-amyrin acetate	C ₃₂ H ₅₂ O ₂
96204	2-Lauroleic acid	C ₁₂ H ₂₂ O ₂
439262	Beta-glucan	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆
444679	Ergosterol	C ₂₈ H ₄₄ O
466466	L-Uridine	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆
5283628	Stellasterol	C ₂₈ H ₄₆ O
5318116	Hydrangeic acid	C ₁₅ H ₁₂ O ₄
5351516	Ergosterol peroxide	C ₂₈ H ₄₄ O ₃
5460935	Turanose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
5471852	Poricoic acid B	C ₃₀ H ₄₄ O ₅
5484385	Pachymic acid	C ₃₃ H ₅₂ O ₅
5742590	Daucosterol	C ₃₅ H ₆₀ O ₆
9803310	Eburicol	C ₃₁ H ₅₂ O
10181133	Cerevisterol	C ₂₈ H ₄₆ O ₃
10743008	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-Dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₄
11127487	Ethyl glucoside	C ₈ H ₁₆ O ₆
12309443	Trametenolic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₃
12314446	Tumulosic acid	C ₃₁ H ₅₀ O ₄
15250826	Dehydroeburicic acid	C ₃₁ H ₄₈ O ₃

性成分度值越高,作用的潜在靶点越多,活性成分的程度值越高说明该成分越可能是核心活性成分。该网络中每个活性成分平均有 13.7 个靶点,度值中位数为 9。拓扑分析结果显示,15 个活性成分的作用靶

点 ≥ 10 个,其中麦角胺(8223)、齿孔醇(9803310)、腺嘌呤(190)、去氢齿孔酸(15250826)等四个活性成分的作用靶点 ≥ 30 个,上述 15 个高度值活性成分可作为朱茯苓的核心活性成分。图 1 为朱茯苓的

化合物-靶点相互作用网络, 橙色节点为靶点, 蓝色节点为活性成分, 其中深蓝色节点为核心活性成分。表 2 为 $\text{degree} \geq 10$ 的核心活性成分拓扑参数表。

表 2 核心活性成分拓扑参数表

Table 2 The topological parameters of core active ingredients

PubChem 标识 PubChem CID	化合物分子名称 Molecule name	度 Degree
8223	Ergotamine	53
9803310	Eburicol	52
190	Adenine	35
15250826	Dehydroeburicoic acid	32
15448	2-Undecanol	28
73402	Eburicoic acid	26
12309443	Trametenolic acid	25
12314446	Tumulosic acid	25
8194	Dodecanal	23
73299	Hederagenin	20
5484385	Pachymic acid	16
3893	Lauric acid	14
985	Palmitic acid	13
92156	Beta-amyrin acetate	13
5742590	Daucosterol	12

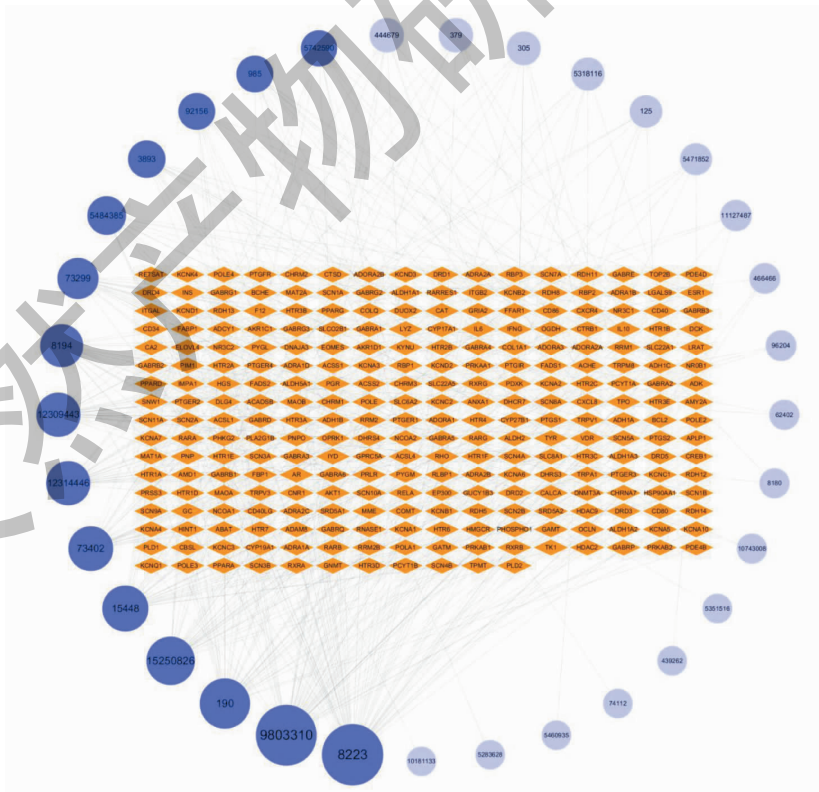


图 1 朱茯苓治疗失眠的化合物-靶点网络图

Fig. 1 The compound-target network of Zhufuling in the treatment of insomnia

2.3 交集靶点间的相互作用网络

从 OMIM 数据库、TTD 数据库、CTD 数据库和 GeneCards 数据库共筛选到 258 个失眠相关靶点,朱茯苓的潜在靶点与失眠相关靶点共存在 36 个交集靶点,将 36 个交集靶点上传 String 数据库,获得高置信度的靶点间相互作用信息,在 Cytoscape 中构建交集靶点间的相互作用网络。使用 Network Analyzer 进行拓扑分析,结果为介度中心度 (betweenness

centrality, BC) 中位数为 0.026 338 32, 紧密中心度 (closeness centrality, CC) 中位数为 0.45, 度 (degree) 中位数为 5, 表 3 为核心靶点的拓扑参数表, 图 2 为朱茯苓治疗失眠的预测靶点间相互作用网络图, 节点直径与度值大小成正比, 深色节点为核心靶点。结果表明共有 13 个靶点的拓扑参数满足上述中位数卡值, 可作为朱茯苓治疗失眠的核心靶点。

表 3 朱茯苓治疗失眠的核心靶点拓扑参数表

Table 3 The topological parameters of core target points of Zhufuling in the treatment of insomnia

基因标识 Gene symbol	靶点名称 Target name	介度中心度 Betweenness centrality	紧密中心度 Closeness centrality	度 Degree
CXCL8	Interleukin 8	0.445 899 08	0.574 468 09	13
AKT1	AKT serine/threonine kinase 1	0.126 231 98	0.490 909 09	11
IL6	Interleukin 6	0.062 861 67	0.482 142 86	10
IL10	Interleukin 10	0.026 338 32	0.457 627 12	9
DRD2	Dopamine receptor D2	0.102 817 10	0.509 433 96	8
DRD4	Dopamine receptor D4	0.102 817 10	0.509 433 96	8
HTR1A	5-Hydroxytryptamine receptor 1A	0.105 734 55	0.500 000 00	8
DRD3	Dopamine receptor D3	0.087 164 89	0.450 000 00	7
RELA	RELA proto-oncogene, NF- κ B subunit	0.063 010 23	0.490 909 09	7
GABRA1	Gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit alpha1	0.200 000 00	1.000 000 00	6
GABRB2	Gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit beta2	0.116 666 67	0.857 142 86	5
GABRG2	Gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit gamma2	0.033 333 33	0.857 142 86	5
NR3C1	Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1	0.046 530 71	0.465 517 24	5

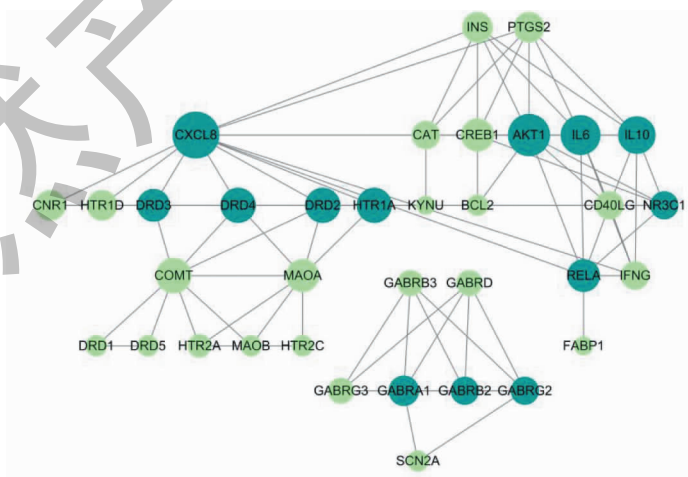


图 2 朱茯苓治疗失眠的靶点蛋白高置信度交互作用网络图

Fig. 2 The high confidence interaction network of target protein of Zhufuling in the treatment of insomnia

2.4 器官定位结果

基于 BioGps 数据库对朱茯苓治疗失眠的潜在

靶点进行器官定位分析, 结果见图 3, 图 3 为朱茯苓治疗失眠潜在靶点的器官定位图, 其中深红色靶点

为核心靶点。结果表明 36 个交集靶点中 11 个靶点作用于脑,6 个靶点作用于心,3 个靶点作用于肝,2 个靶点作用于肺,14 个靶点作用于淋巴、小肠等其他器官。说明朱茯苓主要通过作用于脑、心及淋巴等器官的共同作用实现对失眠的治疗效果。

2.5 富集分析结果

图 4 为 GO 功能富集分析条形图,GO 功能富集分析共富集到 $P < 0.05$ 的 GO 条目 189 个,包括 154 个生物过程 (biological process, BP) 条目、16 个细胞组分 (cell components) 条目、19 个分子功能 (molecular function) 条目。其中 GABA 信号通路 (gamma-aminobutyric acid signaling pathway)、5-羟色胺 (5-HT) 信号通路 (serotonin receptor signaling pathway)、多巴胺 (DA) 突触传递 (synaptic transmission, dopaminergic)、GABA-A 型受体活动 (GABA-A receptor activity) 等条目 P 值小且与失眠密切相关。图 5 为

KEGG 通路富集分析气泡图,KEGG 通路富集分析共富集到 24 条与失眠相关的通路,其中刺激神经组织的互动 (neuroactive ligand-receptor interaction)、DA 能神经突触 (dopaminergic synapse)、5-HT 神经突触 (serotonergic synapse)、逆行神经信号 (retrograde endocannabinoid signaling)、cAMP 信号通路 (cAMP signaling pathway)、GABA 受体神经突触 (GABAergic synapse) 等条目 P 值最小。

2.6 化合物-靶点-通路网络

在 Cytoscape 中构建化合物-靶点-通路网络,图 6 为朱茯苓治疗失眠的化合物-靶点-通路网络图,其中深绿色节点为核心活性成分,深蓝色节点为核心靶点。网络共有 79 个节点和 188 条边,包括 24 种活性成分,33 个靶点和 24 条 KEGG 通路。可见,朱茯苓通过多种成分的多个靶点作用于多条失眠相关的通路,实现对失眠的治疗作用。

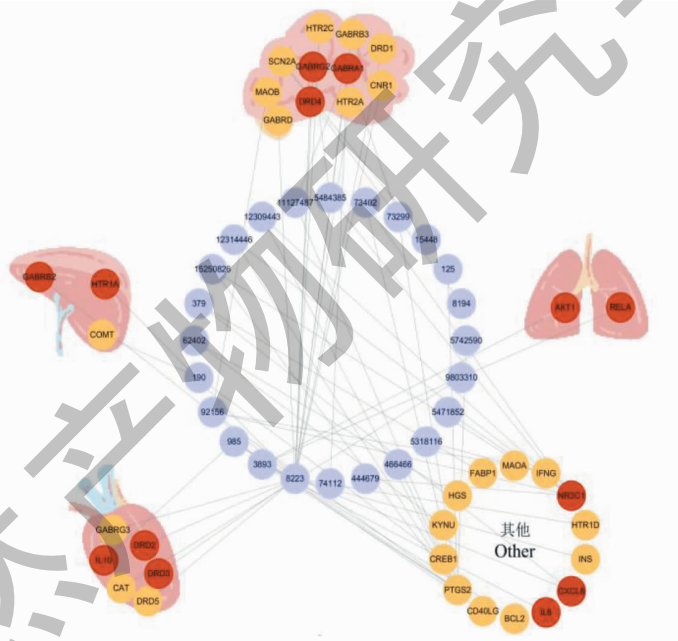


图 3 朱茯苓治疗失眠潜在靶点的器官定位图

Fig. 3 The organ location map of potential target of Zhufuling in the treatment of insomnia

2.7 分子对接结果

选取两个核心靶点 GABRA1 和 GABRG2 与相应核心活性成分进行分子对接。从 PDB 数据库筛选的 GABRA1 受体蛋白 PDB-ID 为 6HUK, Ligand-ID 为 HOZ; GABRG2 受体蛋白 PDB-ID 为 6HUJ, Ligand-ID 为 NAG。使用分子对接模拟软件 Autodock_vina 对 GABRA1、GABRG2 两个靶点与 10 个核心活性成分及阳性对照药物艾司唑仑进行分子对接验证,计算活性

成分、艾司唑仑与受体蛋白间的最低结合能。

表 4 为分子对接最低结合能计算结果,图 7 为茯苓酸与两种受体蛋白的分子对接可视化结果。表 4 结果表明所有活性成分与受体蛋白的最低结合能均远小于 -5.0 kJ/mol, 结合图 7 的分子对接可视化结果,可以说明, GABRA1、GABRG2 两个靶点能够与活性成分自发结合并借助氢键等分子间作用力形成较为稳定的构象。

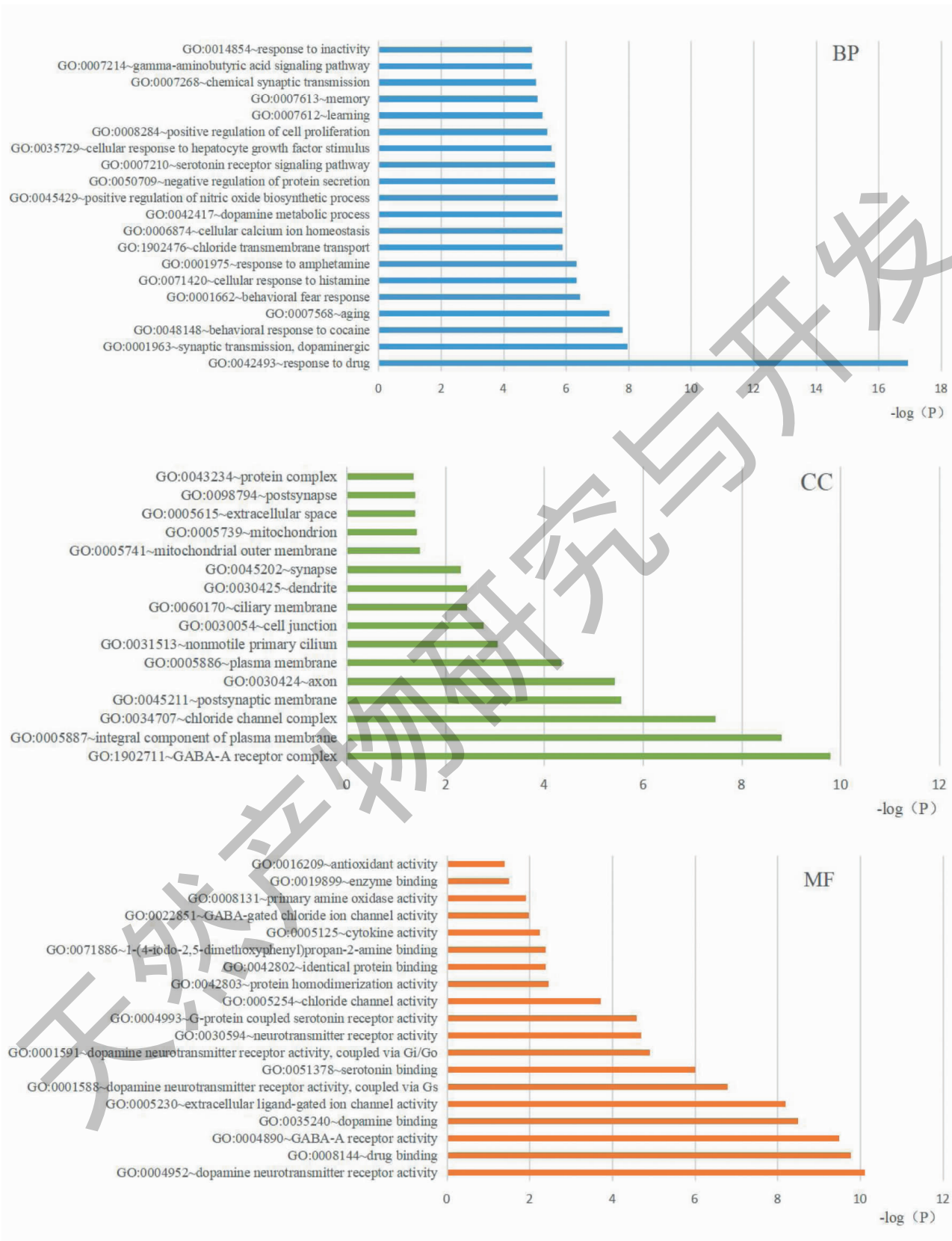


图 4 GO 生物功能富集条形图

Fig. 4 The bar chart of GO biological function enrichment

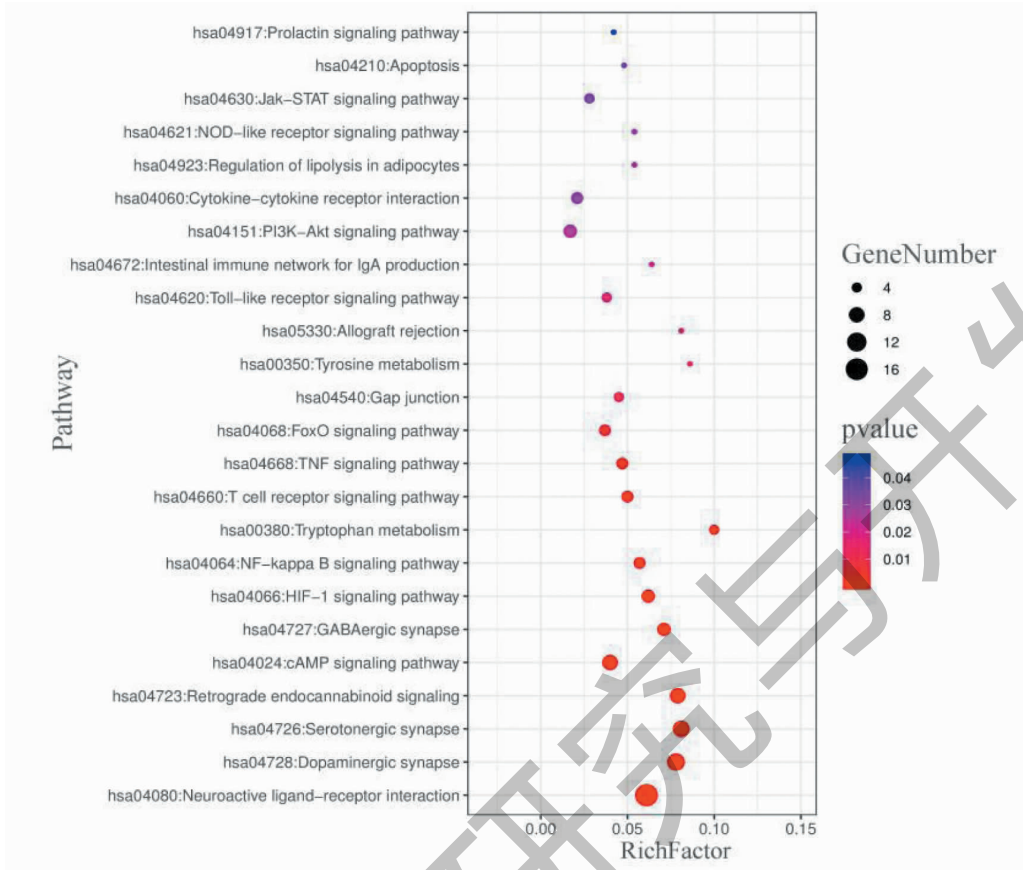


图5 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 5 The bubble chart of KEGG pathway enrichment analysis

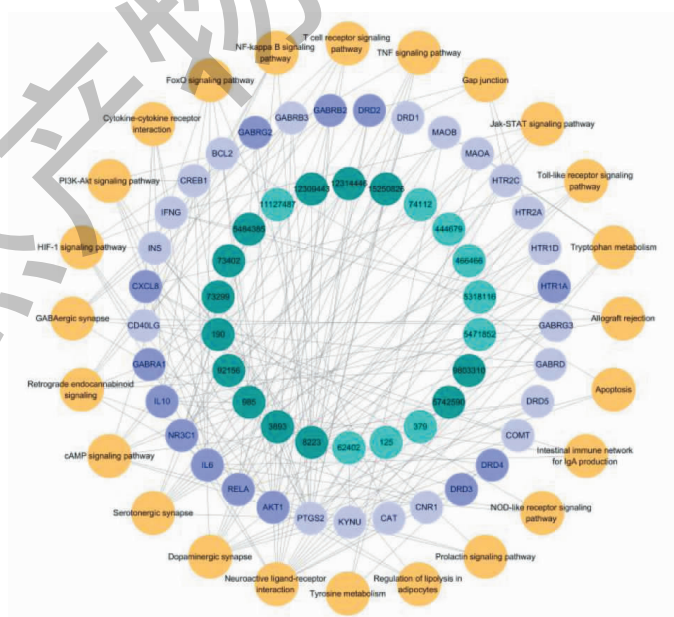


图6 朱茯苓治疗失眠的化合物-靶点-通路网络

Fig. 6 The compound-target-pathway network of Zhufuling in the treatment of insomnia

表 4 活性成分与受体蛋白的最低结合能

Table 4 The minimum binding energy of active ingredients and receptor proteins

PubChem 标识 PubChem CID	化合物分子名称 Molecule name	与 GABRA1 结合能 Affinity with GABRA1 (kJ/mol)	与 GABRG2 结合能 Affinity with GABRG2 (kJ/mol)
8223	Ergotamine	-42.3	-27.2
9803310	Eburicol	-40.6	-21.3
15250826	Dehydroeburicoicacid	-38.9	-22.2
73402	Eburicoic acid	-38.5	-21.3
12309443	Trametenolic acid	-39.8	-22.2
12314446	Tumulolic acid	-37.7	-23.4
73299	Hederagenin	-43.5	-23.9
5484385	Pachymic acid	-33.1	-22.6
92156	Beta-amyrin acetate	-44.0	-22.2
5742590	Daucosterol	-36.4	-20.9
3261	Estazolam	-38.9	-23.8

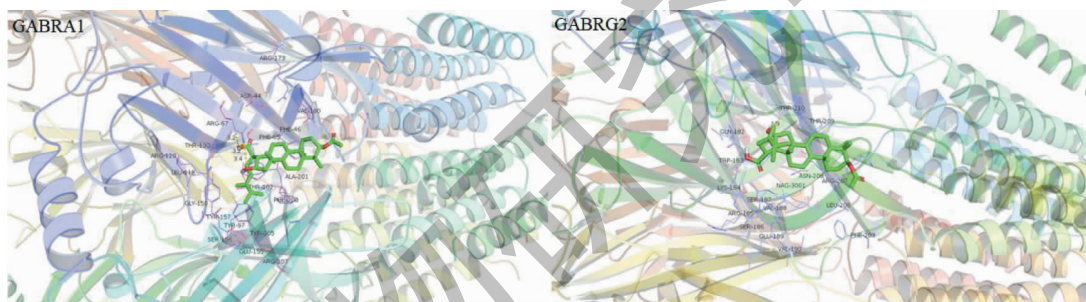


图 7 茯苓酸(5484385)与两种受体蛋白的分子对接可视化结果

Fig. 7 The visualization results of molecular docking between pachymic acid (5484385) and two receptor proteins

2.8 朱茯苓对小鼠脑组织 GABRA1 和 GABRG2 蛋白表达的影响

Western blot 结果见图 8 和图 9。与生理盐水组

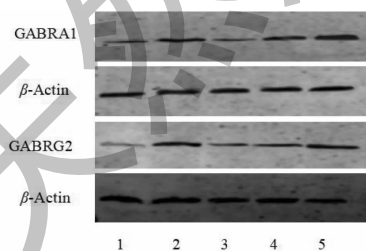


图 8 各组小鼠脑组织中 GABRA1 和 GABRG2 蛋白表达电泳

Fig. 8 The expression electrophoresis of GABRA1 and GABRG2 in brain tissue of mice in each group

注:1~5 分别为生理盐水、艾司唑仑、朱茯苓水煎液低、中、高剂量组。Note:1-5 are saline, estazolam, Zhufuling water decoction low, medium and high dose groups, respectively.

比较,朱茯苓中、高剂量组小鼠脑组织中 GABRA1 和 GABRG2 蛋白表达明显增加($P < 0.01$)可以说明朱茯苓在一定剂量时可以促进 GABRA1 和 GABRG2 蛋白的表达。

3 讨论

朱茯苓具有镇静安神的功效,是治疗失眠不寐的常用中药,临床上应用广泛且疗效显著。本研究基于多成分、多靶点作用的研究思路,应用网络药理学技术,分析朱茯苓治疗失眠的靶点,阐述朱茯苓治疗失眠的机制,为朱茯苓的实验研究及临床应用提供科学依据。

茯苓主要含三萜类和多糖类两种化合物,此外还含有其他成分如甾体类、氨基酸、挥发油、胆碱、腺嘌呤及钾盐等微量元素^[10]。在化合物-靶点网络中高度值、含有多个作用靶点的核心活性成分多为三萜类化合物及其衍生物,如茯苓酸(5484385)、土莫

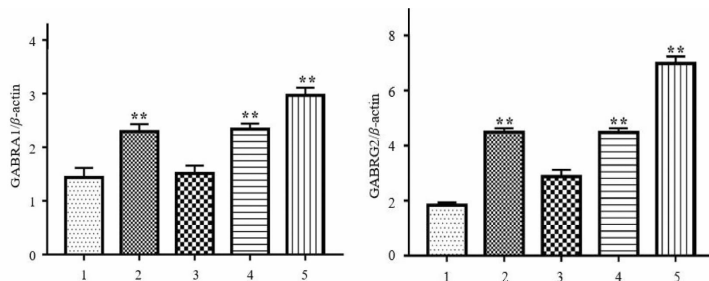


图9 朱茯苓水煎液不同剂量对小鼠脑组织 GABRA1 和 GABRG2 蛋白表达的影响 ($n=3$)

Fig. 9 Effect of Zhufuling decoction on protein expression of GABRA1 and GABRG2 in brain tissue of mice ($n=3$)

注:与生理盐水组比较, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with the normal saline group, ** $P < 0.01$ 。

酸 (12314446)、齿孔酸 (73402)、去氢齿孔酸 (15250826) 等。三萜类化合物具有广泛的药理活性,如利尿、抗氧化、抗肿瘤、抗炎、镇静等^[11]。有研究表明,茯苓总三萜能对抗电休克及戊四唑惊厥发作,其机制与降低海马区门冬氨酸 (Asp) 和谷氨酸 (Glu) 含量有关,具有镇静兴奋性神经元和抗惊厥等作用^[12]。Gao 等^[13] 研究发现茯苓总三萜具有显著的镇静作用,并能调节大脑中 GABA 和 Glu 的含量。朱砂是一种矿物药,归心经,中医以其为安神要药,临床上主要用于失眠多梦,心悸易惊,小儿惊风等,具有解毒安神、清心镇惊的功效,效果较好。Li 等^[14] 对朱砂进行的研究结果显示,朱砂的抗心律失常作用可能是其镇心安神功效的主要基础之一。朱砂含有 HgS、MgS、Bi、Fe、Ba、Mn、Sb、As、Hg²⁺、HgCl₂ 等^[15],HgS 不溶于水,在机体内很难吸收,但它是朱砂的主要活性成分,可在人体内酸效应及络合效应的作用下发生解离,并与体内的氨基酸等生物分子发生络合反应后生成具有强烈生理活性及毒性较小的络合物从而发挥药效^[16]。朱砂所含的可溶性汞盐溶于水,游离汞和微量元素不溶于水,朱砂的主要毒性成分是可溶性汞盐^[17],由于朱砂有毒,因此临床上使用朱砂时一般需将其采用水飞炮制后再使用,水飞可降低朱砂中的可溶性汞盐含量,从而达到减毒增效的作用。朱茯苓,其实就是朱砂均匀拌于茯苓的表面而制得的,因此朱茯苓含有朱砂和茯苓两种中药,其中朱砂用量较少,因此笔者猜测朱茯苓发挥镇静安神作用的成分主要来源于茯苓,而朱砂可能是通过与茯苓相协同,达到增强宁心安神的效果。在进行网络药理学研究时,朱茯苓同时具有朱砂和茯苓两种中药的化学成分,然而 TCMID 和 BATMAN-TCM 等数据库中所对应的朱砂的成分只提供了 HgS 的信息,因此在活性成分的选择上,

选取了茯苓的比较常用的活性成分和朱砂中的主要成分 HgS。在活性成分筛选时考虑活性成分的 OB 值和 DL 值,并结合文献报道,纳入某些 OB 和 DL 值很低但文献报道其活性较好的活性成分。

基于 BioGPS 数据库进行的交集靶点器官定位分析结果显示,朱茯苓主要通过作用于脑、心、肺、肝、淋巴等器官实现对失眠的干预效果。中医认为脑为“元神之府”,主生命活动、精神意识及感觉运动,脏象学说将脑的生理病理统归于心而分属于五脏中。心为“君主之官”,主藏神,与脑协同作用调控人的精神、意识、思维等;主血脉,将血上供于脑,血足则脑髓充盈。心脑相通,则神志活动正常,睡眠良好。同时朱茯苓潜在靶点的多器官分布体现了中医理论的整体观,即各脏器间互相影响、互相联系、协同作用,实现对整个机体的调节^[18]。

利用 Autodock_Vina 对 GABRA1 和 GABRG2 两个靶点与 10 个核心活性成分进行分子对接验证,结果显示上述两个靶点的受体蛋白均能与核心活性成分较稳定的自发结合,而且大部分活性成分与靶点蛋白的最低结合能高于阳性对照的最低结合能。由此可以推测,朱茯苓可能通过茯苓酸等活性成分作用于 GABA 受体,从而达到治疗失眠的效果。

在 Western blot 实验验证部分结果显示,相对于空白组,艾司唑仑组、朱茯苓中、高剂量组小鼠脑组织中 GABRA1 和 GABRG2 蛋白表达明显增加 ($P < 0.01$),说明朱茯苓能够提高脑内 GABRA1 和 GABRG2 两种受体蛋白的表达,证实了朱茯苓是通过 GABRA1、GABRG2 两个核心靶点的基因及蛋白的直接作用,从而发挥其药理作用的。同时,Shah 等^[19] 的研究发现,茯苓酸可通过介导 GABA 能系统增强戊巴比妥的催眠作用,茯苓酸可以改变 GABA 受体各亚基的水平从而达到镇静催眠的效果,与

Western blot 实验结果共同印证了分子对接结果的合理性。

GO 功能和 KEGG 通路富集分析结果中, GABA 信号通路、5-HT 信号通路、5-HT 神经突触、GABA 受体神经突触、DA 突触传递等条目 *P* 值较小且富集基因较多。GABA 是一种抑制性神经递质, 具有催眠、镇静和抗焦虑等功能。GABA 的调控通过 GABA 受体发挥作用, $\alpha 1$ 与 $\beta 2$ 和 $\gamma 2$ 组成的 GABA-A 受体亚型在脑内数量最多, 约占全部 GABA-A 受体的 43%^[20]。Jiang 等^[21]发现内因性失眠症患者中枢重要的抑制性神经递质 GABA 显著降低。Winkelman 等^[22]从质子磁共振谱得出, 原发性失眠患者 GABA 水平较对照组低 30%。大多数镇静催眠药物共有的主要药理作用机制是通过神经递质 GABA 或通过刺激 GABA-A 受体、抑制 5-HT 的 1A 受体发挥镇静作用, GABRA 等基因所参与的神经活性配体-受体相互作用通路与神经递质的传递在失眠的治疗过程中发挥着重要的作用^[23]。5-HT 和 DA 是大脑内单胺类神经递质, 5-HT 的各受体亚型具有调节睡眠、觉醒周期的作用, 激动突触前 5-HT_{1A} 自身受体, 可延长慢波睡眠, 减少觉醒; 激动突触后 5-HT_{1A} 受体, 可抑制睡眠并促进觉醒^[24]。DA 起着维持觉醒和行为兴奋的作用。当各种原因使其维持觉醒和行为兴奋的作用受到抑制时, 亦可影响睡眠、觉醒周期。相关研究证明^[25], 失眠患者的 5-HT、DA 水平与健康人群存在明显差异, 而通过药物改善患者的 5-HT、DA 水平, 可以有效地改善患者的失眠症状。由此可见, 朱茯苓对 GABA、5-HT 和 DA 等神经递质的调节可能是朱茯苓治疗失眠的重要机制。

综上所述, 本研究应用网络药理学方法对朱茯苓治疗失眠的靶点进行了分析, 对 36 个交集靶点进行了器官定位分析, 对 GABRA1 和 GABRG2 两个靶点进行了分子对接模拟, 验证了 GABA 能系统机制的重要作用及核心活性成分筛选的合理性, 为实验验证提供依据。化合物-靶点-通路网络体现了朱茯苓多成分、多靶点、多途径的作用特点。富集分析结果提示 GABA 信号通路、5-HT 信号通路、DA 突触传递等通路和生物过程的重要作用。本研究为朱茯苓治疗失眠机制的进一步研究提供了新思路和新方法, 为朱茯苓的临床应用提供了科学依据。

参考文献

1 Zhong Y, Zheng Q, Hu PY, et al. Sedative and hypnotic

- effects of inhalation of compound Anshen essential oil and GC-MS analysis of chemical constituents [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31:1528-1536.
- 2 Merrigan JM, Buysse DJ, Bird JC, et al. JAMA patient page. Insomnia [J]. Jama, 2013, 309(7):733.
- 3 Zhou PM. Syndrome differentiation and treatment of insomnia from "Five Spirits" [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med(陕西中医), 1999, 20:353-354.
- 4 Guo X, Guo RJ, Xing J, et al. Mechanism of Ningxin Anshen Fang in regulation of unbalanced Glu/GABA-Gln metabolic loop in insomnia [J]. Beijing J Tradit Chin Med(北京中医药大学学报), 2017, 40:413-419.
- 5 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol 1(中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 240-241.
- 6 Huang S, Pan YW, Lan H, et al. Research Progress on pharmacology of pachymic acid [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2015, 37:2719-2721.
- 7 Wang LY, Liu ZX. A Comparative study on the effects of Yangxin Anshen drug and Zhenzhen Anshen drug on sleep duration [J]. World J Sleep Med(世界睡眠医学杂志), 2019, 6:1469-1471.
- 8 Drug Administration of Anhui Province. Chinese herbal pieces processing standard of Anhui Province(安徽省中药饮片炮制规范) [M]. Hefei: Anhui Science and Technology Press, 2019:204-205.
- 9 Shang ZH, Pan CZ, Ma YH, et al. Study on the mechanism of Xiaoyaosan in the treatment of primary liver cancer based on network pharmacology and molecular docking [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32:1302-1315.
- 10 Feng YL, Zhao YY, Ding F, et al. Chemical constituents of surface layer of *Poria cocos* and their pharmacological properties (I) [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38:1098-1102.
- 11 Zhang QQ, Wang MZ, Wang HK, et al. The influence on hippocamp amino acid content of the total triterpene of poria in rats [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2009, 25:279-280.
- 12 Zhang QQ, Wang MM, Wang HK, et al. Experimental study on anticonvulsant effect of total triterpenoids from *Poria cocos* [J]. Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovasc Dis(中西医结合心脑血管病杂志), 2009, 7:712-714.
- 13 Gao Y, Yan H, Jin R, et al. Antiepileptic activity of total triterpenes isolated from *Poria cocos* is mediated by suppression of aspartic and glutamic acids in the brain [J]. Pharm Biol, 2016, 54:2528-2535.

- 14 Li ZW, Dong GL, Jiang CF, et al. Study on the efficacy of cinnabar and cinnabar Anshen pill in relieving anxiety[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1993, 18:436-437.
- 15 Gao YQ. Safety analysis of cinnabar[J]. Chin J Clin Ration Drug Use(临床合理用药杂志), 2014, 7(4):78-79.
- 16 Liu J. Research Progress on pharmacological action, toxicity and processing method of cinnabar[J]. Contemp Med Symp(当代医药论丛), 2020, 18(8):199-201.
- 17 Zhang X, Bian JS. Hydrogen sulfide: a neuromodulator and neuroprotectant in the central nervous system[J]. ACS Chem Neurosci, 2014, 5:876-883.
- 18 Shen X, Xu RR, Pei LS, et al. Molecular mechanism of heat-clearing and detoxifying efficacy of *Forsythia suspensa* based on network pharmacology[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2018, 53:1834-1842.
- 19 Shah VK, Choi JJ, Han JY, et al. Pachymic acid enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors via GABAergic systems in mice[J]. Biomol Ther(Seoul), 2014, 22:314-320.
- 20 Liu J, Li F, Song YH, et al. Gamma-aminobutyric acid system in insomnia[J]. Prog Mod Biomed(现代生物医学进展), 2012, 12:3589-3591.
- 21 Jiang XJ, Xu ZQ, Liu J. The GABA changes of encephalofluetograph in intrinsic insomniacs[J]. Chin J Clin Neurosci(中国临床神经科学), 2005, 13:236-238.
- 22 Winkelman JW. Reduced Brain GABA in Primary Insomnia: Pre-liminary Data from 4T proton magnetic resonance spectroscopy(1H-MRS)[J]. Sleep, 2008, 31:1499-1506.
- 23 Singh A, Zhao K. Treatment of insomnia with traditional Chinese herbal medicine[J]. Int Rev Neurobiol, 2017, 135:97-115.
- 24 Zhang SB, Wang P, Tian DZ, et al. Effects of Jujuboside on amino acid neurotransmitters and its receptor expression in the brain of syndrome insomnia old rats[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(4):124-127.
- 25 Tong QY, Zhang YX. Study on the clinical value of cognitive behavioral therapy for insomnia in anxiety disorder[J]. World Latest Med Inf(世界最新医学信息文摘), 2019, 19(14):98-99.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林	刘相国
WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin	LIU Xiangguo
孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉	汪海波
SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo
沐万孟	张炳火	陈益华	林昌俊	欧阳杰	易华西
MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	CHEN Yihua	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi
罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛	夏永刚	高慧敏
LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin
唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕	曾克武	蓝蔚青
TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan	ZENG Kewu	LAN Weiqing
廖晨钟	薛永波				
LIAO Chenzhong	XUE Yongbo				